

学位論文題名

Involvement of pRB-Related p107 Protein
in the Inhibition of S-Phase Progression
in Response to Genotoxic Stress

(DNA 傷害性ストレスに対するレチノブラストーマ癌抑制遺伝子産物
(pRB) 相同分子・p107による DNA 合成期進行の抑制について)

学位論文内容の要旨

pRB、p107、p130 からなる pRB ファミリー蛋白質は、転写因子 E2F との相互作用を介して、細胞周期が G 1 から S 期に移行するのを抑制する増殖制御分子と考えられている。細胞周期が G 1 後期にある G 1 チェックポイントを通過していく際、pRB ファミリー蛋白質は G 1 サイクリン-サイクリン依存性キナーゼによるリン酸化を受け機能的に不活化される。このような G 1 期における制御機構に一致して、pRB 及び p130 は増殖を停止している細胞で豊富に発現している。一方、これに対して p107 は、静止期の細胞において発現量は極わずかであることが知られている。そして、G 1 後期から S 期 (DNA 合成期) に進行していく過程で p107 の発現は急激に増大するため、p107 が S 期において何らかの細胞周期制御を行う可能性が以前から示唆されていた。

今回の研究では、リン酸化を受けない構成的活性化分子と考えられる変異型 p107 (リン酸化耐性変異型 p107) の発現が、野生型と異なり S 期進行を著明に抑制することをまず証明した。その際、S 期進行を抑制するために必要なリン酸化耐性変異型 p107 の発現量は、内因性の p107 の発現量に比べ極わずかであった。次に、シスプラチンの投与により S 期細胞に DNA 損傷を与えたところ、S 期進行が抑制されるのに伴い活性型である低リン酸化型 p107 の集積が起こった。さらには、シスプラチンによる S 期進行の抑制効果は、野生型 p107 の異所性発現によって増強され、逆に、pRB ファミリー蛋白質の機能を中和する癌遺伝子産物アデノウイルス E1A の発現によって減弱した。

以上の結果より、S 期の細胞で主に発現している pRB ファミリー蛋白質は p107 であることから、S 期細胞が DNA 損傷を受けた場合、p107 は非活性型から活性型に変換され、DNA 合成の進行を抑制することが明らかになった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 小 池 隆 夫

学 位 論 文 題 名

Involvement of pRB-Related p107 Protein in the Inhibition of S-Phase Progression in Response to Genotoxic Stress

(DNA 傷害性ストレスに対するレチノブラストーマ癌抑制遺伝子産物
(pRB) 相同分子・p107による DNA 合成期進行の抑制について)

pRB、p107、p130 からなる pRB ファミリー蛋白質は、転写因子 E2F との相互作用を介して、細胞周期が G 1 から S 期に移行するのを抑制する増殖制御分子と考えられている。細胞周期が G 1 後期にある G 1 チェックポイントを通過していく際、pRB ファミリー蛋白質は G 1 サイクリン-サイクリン依存性キナーゼによるリン酸化を受け機能的に不活化される。このような G 1 期における制御機構に一致して、pRB 及び p130 は増殖を停止している細胞で豊富に発現している。一方、これに対して p107 は、静止期の細胞において発現量は極わずかであることが知られている。そして、G 1 後期以降に p107 の発現は急激に増大し S 期 (DNA 合成期) にそのピークをむかえることから、p107 が S 期において何らかの細胞周期制御を行う可能性が以前から示唆されていた。

今回の研究では、p107 の機能を解明するため、構成的活性化分子と考えられるリン酸化耐性 p107 分子を作成し、BaF3 リンパ球細胞株を用いて野生型 p107 及びリン酸化耐性変異型 p107 を誘導的に発現できる複数のトランスフェクタントを作成した。これらの発現が細胞周期に及ぼす影響を検討するため、細胞周期を同調させた後免疫ブロット法ならびにフローサイトメトリーによる解析を加えた。その結果、野生型 p107 の異所性発現が細胞周期進行に有意な影響を与えなかったのに対し、リン酸化耐性変異型 p107 の発現により S 期進行がほぼ完全に阻止された。その際、S 期進行を抑制するために必要なリン酸化耐性変異型 p107 の発現量は、内因性の p107 の発現量に比べ極わずかであった。次に、S 期に同調させた細胞に DNA 損傷物質シスプラチンを投与したところ、S 期進行が著明に抑制されるのに伴い活性型である低リン酸化型 p107 の集積が認められた。さらには、DNA 損傷による S 期進行の抑制効果は、野生型 p107 の異所性発現によって増強され、逆に、pRB ファミリー蛋白質の機能を中和するアデノウイルス由来 E1A 蛋白の発現によって減

弱した。以上の結果より、DNA 損傷を受けた S 期細胞において、p107 は非活性型から活性型に変換され、DNA 合成の進行を抑制することが明らかになった。

公開発表において、副査の今村教授より相異なる発現パターンを有する p130 と p107 の発現調節機構、p107 の臨床応用について質問があった。次に、副査の小池教授より p107 のリン酸化異常による疾患の有無、免疫系との関係、自己免疫疾患への臨床応用について質問があった。そして、主査の長嶋教授より変異型 p107 において全てのリン酸化部位に変異を入れた必要性、変異型 p107 の生理的機能について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究結果や文献的知識を引用し、概ね適切な解答をした。

この論文は、生理的条件下で発現している p107 が、DNA 損傷を受けた細胞において、DNA 合成の進行を抑制し修復に必要な時間を稼ぎ、異常な DNA が複製されるのを防止する役割の一端を担っていることを初めて明らかにした点で高く評価され、今後抗癌剤に対する作用調節やあらゆる細胞の増殖制御機構の解明及びその臨床応用に役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。